

Approved For Release STAT  
2009/08/31 :  
CIA-RDP88-00904R000100130

Dec 1988

Approved For Release  
2009/08/31 :  
CIA-RDP88-00904R000100130



Вторая Международная конференция  
Организации Объединенных Наций  
по применению атомной энергии  
в мирных целях

А/СОНР/15/Р/5726  
ППД  
ОГРН 1155000000000

Не подлежитглашению до официального сообщения из Конференции

ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ И РАДИОМИМЕТИЧЕСКИХ  
ВЕЩЕЙ НА МИКРОБНУЮ КЛЕТКУ

М.Н.Мейсель, Р.Д.Гольцова, Г.А.Медведева,  
Н.А.Помощникова, Л.А.Селиверстова и И.Н.Шолынова

Исследование закономерностей действия ионизирующих излучений на клетку вообще и на микробную клетку в частности имеет существенное научное значение в двух отчношениях: специально радиобиологическом и в общепатологическом. Своебразная патология, вызываемая излучениями, позволяет более четко выявить амплитуду реактивных возможностей клетки, лучше оценить относительную самостоятельность и вместе с тем взаимосвязанность отдельных ее функций.

В предыдущем сообщении (1) мы рассмотрели преимущественно те стороны реакции микробной клетки, в основе которых лежат нарушения в фосфорном (и в частности в нуклеиновом) и лишь отчасти в азотном и углеводном обмене. Из структур клетки наше внимание естественно было обращено на ядра и на цитоплазму в целом. В данном сообщении мы приводим некоторые результаты исследования тех процессов, которые преимущественно связаны с цитоплазматическими структурами — митохондриями и микросомами.

В этих исследованиях в качестве объектов использовали дрожжевые организмы *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Torulopsis utilis*, *Endomyces fragilis*. Клетки облучали либо в водных суспензиях, либо в виде отпрессованной массы. Цитологические, физиологические и биохимические исследования проводили как тотчас же после облучения, так и после подращивания на агаризованной питательной среде. При подращивании обращали особое внимание на то, чтобы размножение (деление, почкование) клеток было возможно меньшим; с этой целью посевы производили на поверхность агаровых сред восьми концентрированными суспензиями. В таких условиях увеличение массы облученных клеток про-

-2-

исходит преимущественно за счет их роста, а не размножения, т.е. осуществляется метаболизм, но сопровождающийся делением ядер и клеток. В этом случае даже при облучении в больших дозах не погибает сколько-нибудь заметного количества клеток, по крайней мере в течение 24 час. после облучения. Наблюдения под флуоресцентным микроскопом (при витальной обработке суспензий примулином и окридиновым оранжевым) подтверждают, что отмирания облученных клеток не происходит.

Обычно видимые нарушения в клеточных структурах обнаруживаются в первую очередь у клеток с активным метаболизмом. В клетках со сниженным обменом непосредственно возникающие в результате облучения структурные повреждения отмечаются только после очень больших доз облучения, во много раз превышающих те, которые дают отчетливый эффект у активно функционирующих клеток. Это указывает на значение процессов клеточного метаболизма в проявлении и усилении начальных лучевых повреждений. Метаболизм играет решающую роль также в восстановлении поврежденных клеточных структур. Можно не сомневаться в том, что "цепной" характер развития лучевой реакции на клеточном уровне в значительной степени определяется особенностями и интенсивностью клеточного метаболизма.

#### Влияние облучения на внутриклеточные окислительные и восстановительные процессы

257

Цитохромная система дрожжевых клеток, как известно, легко может быть исследована при помощи прижизненной спектроскопии по характерным полосам поглощения. Как показали наши наблюдения, спектры цитохромов не подвергаются существенным изменениям при облучении даже в больших дозах. В связи с физиологической активностью митохондрий нас специально интересовали цитохромоксидаза и дегидразная системы.

Активность цитохромоксидазы определяли манометрическим методом по скорости поглощения кислорода гомогенатом из дрожжевых клеток в присутствии системы цитохром с- гидрохинон. Полифенолоксидаза ингибиравалась дистилдитиокарбонатом. Опыты показали, что даже после облучения в дозах 60000-100 000р нельзя было отметить сколько-нибудь значительного снижения активности цитохром-с-оксидазы, если дрожжи предварительно культивировали в условиях относительно-

-3-

го анаэробиоза (бродящие клетки). При аэробном выращивании тех же дрожжей их цитохром-с-оксидаза окислялась менее радиорезистентной: ее активность снижалась после облучения в дозе 100000 р на 20%, а после 24-часового подращивания облученной супензии - на 50%.

Редуцирующую способность дрожжевых клеток учитывали по восстановлению нейтрального красного и януса зеленого. Известно, что нормальные дрожжи энергично восстанавливают эти красители. У облученных клеток эта способность снижается (табл. 1).

Таблица 1

Влияние  $\gamma$ -излучения на восстановление дрожжами нейтрального красного

Доза облучения, р	Восстановление красителя, %
Контроль	100
10 000	88
30 000	85
60 000	80
100 000	67

Еще более чувствительны к облучению ферментные системы, восстанавливающие янус зеленый. Это особенно четко обнаруживается в культурах, выросших в относительно анаэробных условиях (рис.1). Спектрофотометрическое определение количества восстановленного дрожжевыми клетками януса зеленого показывает, что уже после облучения в дозе 5000 р. отмечается повреждение ответственной за данный процесс ферментной системы. У аэробно развивающихся дрожжевых клеток это угнетение выражено менее резко. Интересно отметить, что приживленное наблюдение под микроскопом клеток, митохондрии которых окрашены янусом зеленым, также показывает, что у митохондрий облученных клеток снижена способность восстанавливать этот краситель. Наше данные вполне согласуются с наблюдениями Мартена (23), показавшими, что у облученных дрожжей снижается активность цитохром-с-редуктазы. Исследуя ферментные системы, восстанавливающие янус зеленый, Лазаров и Купертейн (4,5) пришли к заключению, что в

2597

-4-

восстановлении этого краевого существенную роль играет ДНК-дегидратная система. В наших опытах именно ферментная система, восстанавливавшая янтарь зеленый, оказалась особенно чувствительной к действию радиации. Основная локализация ее в митохондриях не подлежит сомнению. Таким образом, угнетение этой ферментной системы, в следовательно, и изменение соответствующих структурных участков в митохондриях может рассматриваться как одно из непосредственных лучевых повреждений органоидов клетки.

**Влияние блокирования внутриклеточных структур на радиоустойчивость клеток**

Из протоплазменных структур особого внимания радиобиологов заслуживают митохондрии - основные энергетические центры клетки, участвующие через промежуточные звенья в ключевых процессах обмена веществ. В митохондриях не только генерируется энергия, но и связывается в результате окислительного фосфорилирования в доступные для использования макроэргические соединения.

За последние годы установлено, что процесс окислительного фосфорилирования в некоторых тканях и органах облученных животных заметно угнетается (6,7); то же происходит и в клетках микроорганизмов (1). При этом интенсивность поглощения кислорода клетками и тканями либо совсем не нарушается, либо изменяется незначительно. Ряд других процессов, регулируемых ферментными системами, расположенными на митохондриях, также подвергается изменениям под влиянием облучения. К их числу относятся процессы, связанные с превращениями пировиноградной кислоты и циклом жирных кислот.

Для активности митохондрий особое значение имеют их поверхности: на них протекают весьма важные в функциональном отношении процессы электривной адсорбции веществ, подвергающихся затем окислению и восстановлению. Прижизненное блокирование этих поверхностей посторонними веществами должно приводить к изменению скорости и характера процессов, осуществляемых митохондриями. В 1950 г. нами совместно с Г.М.Шавловским (8) было проведено такое блокирование митохондрий в клетках дрожжевых организмов флуоресцирующим алкалоидом берберином и показана возможность использования такого приема для изучения физиологического значения внутриклеточных структур.

Нам представлялось существенным изучить влияние блокирования

митохондрий берберином на участки, близкие к облучению клеток и их отдельных физиологических свойств. Для этого сельдьми флуорохромировали дрожжевые клетки (см. методика Грибина и др.) в 4%ном растворе берберин-сульфата (4:10000) в течение 4-5 час. Затем клетки отделяли от суспензирующей жидкости и отмывали от избытка берберина. При исследовании в люминесцентном микроскопе митохондрии представлялись ярко светящимися свето-желтыми, протоплазма и ядра или совсем не светились, или имели весьма слабое диффузное свечение. Суспензии таких прижизненно флуорохромированных клеток подвергали облучению на гамма-установке с радиоактивным кобальтом (мощность дозы 4800 р./мин.). Облучение и параллельно с ними контрольные суспензии исследовали на выживаемость клеток (путем рассеяния из агаризованную питательную среду), определяли интенсивность поглощения  $O_2$  (в аппаратуре Варбурга) и скорость включения меченого фосфата ( $P^{32}$ ) в органические соединения клетки. Полученные нами данные представлены графически на рис.2 и 3. Обработка дрожжевых клеток берберином сама по себе приводит к снижению выживаемости примерно на 40% и соответственно угасает дыхание и фосфорилирование. Тем не менее клетки, блокированные берберином (если расчет производить на количество клеток, оставшихся жизнеспособными), являются более устойчивыми к действию облучения по сравнению с такими же, но не обработанными берберином (см. рис.4). Эта повышенная устойчивость сказалась не только на выживаемости, но проявилась и в меньшей чувствительности к облучению процессов дыхания и фосфорилирования (см. рис.2).

В предыдущих исследованиях (9) было показано, что этиловый спирт и этиловый эфир конкурируют с красителем янусом зеленым, электрически искапливающимся на митохондриях, вытесняя его с поверхности митохондрий. Оба эти вещества способны, следовательно, накапливаться в митохондриях и тем самым блокировать их. Наши опыты показали, что и берберин, подобно янусу зеленому, вытесняется спиртом с поверхности митохондрий. Естественно было поэтому испытать защитное действие этилового спирта, тем более, что в опытах Холлендерса и Стэплтона (10,11) спирт оказывал благоприятное действие на выживаемость облученных *Escherichia coli*.

Мы ставили наши опыты следующим образом. Дрожжевые клетки суспензировали в 4%-ном водном растворе этилового спирта в течение 30-40 минут и затем подвергали облучению. Выдерживание клеток в этиловом спирте такой концентрации не сказывалось сколько-нибудь

существенно ни по их выживаемости, ни по интенсивности дыхания. Однако устойчивость к облучению заметно повышалась у клеток, предварительно обработанных спиртом, и тем отчетливее, чем больше было до-за облучения (рис.4.). Защитное действие спирта скорее связано с блокированием митохондрий, чем с изменением окислительного режима клетки. В пользу этого положения говорят и наши опыты с блокированием клеток этиловым эфиром, который так же, как и спирт, вытесняет с поверхности митохондрий вещества, способные на них накапливаться. Мы насыщали воду эфиром, прибавляя его в количестве 3 и 5%. Дрожжи выдерживали в такой воде в течение 30-40 мин. а затем в ней же подвергали их облучению. Клетки, обработанные эфиром (3%), оказались значительно более устойчивыми к облучению по сравнению с контрольными, необработанными (рис.5).

Полученные нами экспериментальные данные позволяют предположить, что вещества (берберин, этиловый спирт, эфир), энергично накапливающиеся на митохондриях клеток, отчетливо повышают их радиоустойчивость и снижают повреждающее действие ионизирующих излучений на клеточное дыхание и окислительное фосфорилирование. Механизм действия этих веществ скорее всего связан с изменением физико-химических свойств поверхности митохондрий.

#### Действие ионизирующих излучений на процессы аминирования и перевамишивания

В свое время нами было установлено, что облученные дрожжевые клетки, у которых метаболизм продолжается на полноценной питательной среде, образуют значительно больше эргостерина, чем такие же, но необлученные клетки (I2); превышение биосинтеза этого стерина достигает 200%. Параллельно с усиленным образованием стеринов, возрастает и синтез жирных кислот. Вместе с тем, известно, и это было подтверждено в специальных исследованиях одного из нас (I3), что при избытке углеводного и недостатке азотного питания у дрожжей также происходит усиленное накопление жиров и липоидов. Это накопление регулируется азотными соединениями в питательной среде: чем их больше, тем меньше образуется жирных кислот и стеринов. Следовательно, недостаточное участие азотных соединений в обмене веществ клетки, независимо от того, чем оно вызвано - отсутствием источников азотного питания или невозможностью их использования, - в равной мере

-7-

водит к изменению направленности обмена в сторону повышенного синтеза жиров и липоидов. Очевидно, соответствующие звенья углеводного обмена, по крайней мере частично, отключаются от цикла трикарбоновых кислот и вовлекаются в цикл жирных кислот. Если в условиях авотного питания такое переключение метаболизма имеет несомненный физиологический смысл и приспособительное значение, то аналогичная реакция клетки, подвергнутой облучению, очевидно, должна зависеть от нарушения ферментных систем, осуществляющих связь цикла трикарбоновых кислот с авотистым обменом. Здесь в первую очередь привлекают внимание процессы аминирования кетокислот, дезаминирования и переаминирования аминокислот.

Мы провели специальное изучение состояния этих процессов у дрожжевых организмов *Saccharomyces cerevisiae* после их рентгеновского облучения в дозах от 30 до 10 кр.

Исследование аминирования  $\alpha$ -кетокислот проводили по методу Небера (14). В качестве субстрата мы использовали пируват натрия и углекислый аммоний. Процесс аминирования осуществлялся дрожжевым гомогенатом, полученным из растертых с пеком клеток и освобожденным от целых клеток и крупных клеточных фрагментов путем центрифugирования в течение 1 часа (1800 об/мин.). Наши опыты показали, что аминирование  $\alpha$ -кетокислот заметно снижается в клетках уже тотчас же после облучения. При дозе 30 кр это снижение составляет 30% и достигает 75-80% при дозах порядка 100 кр. Облучение в меньших дозах приводило к весьма значительному угнетению аминирования при подсчете облученных дрожжей в течение 24-48 час. (табл. 2).

Исследование переаминирования аминокислот проводили по методу Браунштейна-Крицман (15). Дикарбоновые аминокислоты определялись по методу Формана и Джонс-Мэллера (16), аминоазот аминодикарбоновых кислот - по методу Ван-Слейка.

Таблица 2

Синтез  $\alpha$ -аминокислот из  $\alpha$ -кетокислот и аммиака  
дрожжевыми гомогенатами

Номер опыта	Необлученные культуры (контроль)	Облучение культуры 30 кр, 10 час. (с. радиации)	
		Прирост $\text{NH}_2\text{-N, мкмоль}$	Прирост $\text{NH}_2\text{-N, мкмоль}$ в % к контролю
1	—	—	—
2	73,4	10,4	67
3	94,5	17,2	50

-8-

1	2	3	4
3	95,0	47,5	50
4	72,4	48,3	67
5	72,4	48,3	67
6	71,5	23,8	33
7	83,7	23,9	29

Примечание. В опыты взято 2 мл дрожжевого гомогената, пирувата натрия 0,05 моля, углекислого аммония 0,02 моля. Фосфатный буфер pH 7,0-7,4. Общий объем смеси 10 мл. Инкубация 2 часа при 27-28°C.

Опыты показали, что непосредственно после облучения дрожжей в дозе 60 кр переаминирование аминокислот мало нарушается. Только через 16 час. подращивания оно уменьшается на 20% и через 48 час. — на 70-80% (табл.3). При больших дозах — 100 кр и выше — интенсивность процессов переаминирования аминокислот непосредственно после облучения снижается примерно на 50%.

Таблица 3

Переаминирование глутаминовой кислоты дрожжевыми гомогенатами

№ опыта	Необлученные культуры (контроль)			Облученные культуры (60 кр, 48 час. подращивания)			
	убыль NH <sub>2</sub> -N, мкмоль	добавлено глутаминовой кислоты мкмоль	убыль NH <sub>2</sub> -N, %	убыль NH <sub>2</sub> -N, мкмоль	добавлено глутаминовой кислоты, мкмоль	убыль NH <sub>2</sub> -N %, в контроле	в контроле
I	2	3	4	5	6	7	8
I	29,7	I36	21,8	4,65	I36	3,42	I6
2	24,4	I36	18,0	9,75	I36	7,17	I0
3	24,0	I36	18,0	0	I36	0	-
4	28,9	I36	21,2	8,00	I36	5,88	I28
5	23,8	I36	17,5	0	I36	0	-

-9-

1	2	3	4	5	6	7	8
6	23,0	136	16,9	9,45	136	6,94	41
7	23,0	136	16,9	0	136	0	-

Примечание. В опыт взято дрожжевого гомогената 2 мл, глутаминовой кислоты 20 мг, пирувата натрия 55 мг, 5%  $\text{KHCO}_3$ . Общий объем смеси 10 мл, pH 7,2-7,4. Инкубация 0,2 мл 2 часа при 27-28°.

Таким образом, из обследованных нами процессов наиболее чувствительным к облучению оказался процесс аминирования  $\alpha$ -кетокислот. Он заметно нарушается непосредственно после облучения уже при таких дозах, когда еще не отмечается изменений в процессах переаминирования и дезаминирования аминокислот.

С липонуклеопротеидными структурами клетки непосредственно связано биологически активное вещество мезоинозит. Мы исследовали содержание мезоинозита и его биосинтез облученными дрожжевыми клетками. Во всех случаях отмечалось усиление биосинтеза этого вещества пропорционально дозе облучения. Особенно значительное повышение биосинтеза мезоинозита обнаружено у облученных и затем подращиваемых культур *Torulopsis utilis* (табл. 4). Как видно из таблицы, у этих организмов после облучения общее содержание мезоинозита увеличивается примерно в 15 раз.

Таблица 4

Влияние рентгеновского облучения на биосинтез мезоинозита клетками *Torulopsis utilis*

Свободный и непрочно связанный инозит (в мкг/мл воды экстр.)			Общее количество инозита (в мкг/мл автолизата)		
доза облучения, кр	среднее количество инозита	средний % по отношению к контролю	доза облучения, кр	среднее количество инозита	средний % по отношению к контролю
Необлученный контроль	8	100	Необлученный контроль	10,3	100
60	18	225	60	70,0	636
100	43	537	100	175,0	1580

-10-

Таким образом, паряду с усиливанием биосинтеза жиров и липоидов в облученных дрожжевых клетках происходит также и возрастание синтеза мезоинозита.

Об образовании токсических агентов при  
интенсивном облучении

Представляется очевидным, что для обнаружения токсических веществ в облученном субстрате, особенно если они возникают в небольших количествах, необходимы весьма чувствительные методы.

Интересную попытку в этом направлении недавно сделали Гендерсон, Бакстер и Таттл (17). Они подвергали пекарские дрожжи рентгеновскому облучению в больших дозах (1 000 000р.) и затем культивировали на этом субстрате несколько генераций дрозофилы. Облученные дрожжи в этих условиях, очевидно, не образовывали токсических веществ, так как дрозофилы развивалась вполне нормально. Токсический фактор не был также обнаружен при использовании такого индикаторного организма, как *Tetrahymena pyriformis* (18).

Между тем, значительное количество исследований, проведенных на облученных животных, определенно указывает на возникновение в их организме токсических веществ, которые могут быть обнаружены при помощи различных биологических тестов. Мы не будем останавливаться на этих работах. Отметим лишь одну из последних, в которой был использован микробиологический индикатор: это опыты Мюллера (19), который применил для обнаружения токсических веществ культуру *Escherichia coli* на синтетической среде.

Полученные нами данные указывают на то, что биологически активные вещества, в том числе и токсические, могут возникать в облученном организме в процессе продолжающегося после облучения нанормального обмена веществ.

Для того, чтобы выяснить возможность образования в этих условиях токсических факторов, мы облучали дрожжевой организм *Endomycetes magnusii*, а в качестве индикаторов использовали дрожжи *Saccharomyces ludwigii*. При этом показателем биологической реакции на токсические вещества служила интенсивность их дыхания, которую учитывали манометрически в аппарате Барбурга.

Индикаторные дрожжи суспензировали в жидкой части гомогената облученных клеток *Endomycetes magnusii*, полученного путем их

-11-

растирания с песком и отделения отядко центрифугированием. Подложки исследованию гомогенат готовили либо непосредственно после облучения, либо после выдерживания облученных клеток в воде в течение одних суток, либо после облучения и подрацивания облученных объектов по сусло-агаре. Источником облучения служила кобальтовая установка с мощностью дозы 4860 в 1 мин. Дрожжи облучали при дозе 1 000 000 р.

Таблица 5

Интенсивность дыхания дрожжей  
*Saccharomyces ludwigii*

	Водная сuspен- зия	Суспен- зия на го- могенате необлучен- ных дрож- жей	Суспензия на гомогенате облученных дрожжей		
			непосред- ственно после об- лучения	24 часа выдержи- вания в воде пос- ле облу- чения	24 часа подраци- вания после ос- лучения
$Q_{O_2}$ *)	94,4	97,9	138,0	100	70,8
в %	100	103,7	146,1	105,9	75

\*) количество  $O_2$  в  $mm^3$ , поглощенного за 1 час на 1 мг сухого вещества.

Результаты опытов (табл.5) показывают, что полученная из клеток жидкая часть гомогената, приготовленная непосредственно после облучения, вызывает заметную стимуляцию дыхания индикаторной культуры. После выдерживания облученных клеток в воде в течение одних суток этот стимуляционный эффект прекращается. Гомогенат из клеток, которые после облучения подрачивали 24 часа на питательной среде, оказывает отчетливое угнетающее влияние на дыхание индикаторной культуры дрожжей.

Еще более резкую реакцию на токсические вещества, образующиеся в облученных дрожжах, удалось обнаружить при помощи другого биологического индикатора, а именно амеб, культивируемых стерильно совместно с дрожжами. Амебы типа *Amoeba terricola* хорошо размножаются в такой чистосмешанной культуре, питаясь дрожжами.

Мы облучали эти дрожжи (*Saccharomyces ludwigii*), служащие питательным субстратом для амеб. Облученные дрожжи (доза 1 000 000р) предоставляли амебам в качестве корма непосредственно после облучения, после облучения и выдерживания в воде в течение одних суток и после облучения и подращивания на питательном субстрате также в течение одних суток. В обычных условиях, когда в качестве питательного материала служили необлученные дрожжи, амебы поедали дрожжевую массу, двигаясь сплошным фронтом по посеву. При этом довольно резко выделялась граница массового поедания дрожжей, вблизи которой амебы наиболее активны. Облученные дрожжи как непосредственно после облучения, так и выдержанные в течение одних суток в воде, поедались амебами с одинаковой интенсивностью, причем скорость потребления дрожжевой массы не отличалась от таковой контрольных необлученных дрожжей. Граница выедания во всех случаях была отчетливо видна. Однако при культивировании на облученных дрожжах как непосредственно после облучения, так и после выдерживания в воде амебы мельче. Протоплазма таких амеб грубо зернистая, пищеверительные вакуоли плохо заметны.

Еще более резкая картина изменений наблюдалась при кормлении амеб облученными и затем подрощенными на питательной среде дрожжами. Граница выедания в этом случае вообще отсутствовала. Однако микроскопическое исследование показало, что амебы все же перемещаются в дрожжевой массе, вероятно, в поисках подходящего питательного материала. Многие амебы при этом инцистируются, большинство же их гибнет, не успев переварить поглощенные дрожжи, оказавшиеся для них, по-видимому, токсичными.

Следовательно, в этих опытах особенно отчетливо выявилось неблагоприятное влияние облученных и развившихся после облучения дрожжей на состояние питающихся ими амеб. Таким образом, токсические вещества, по-видимому, образуются в дрожжевых клетках в процессе продолжающегося нарушенного обмена веществ.

#### Особенности действия радиомиметических веществ на микробную клетку

Известно, что биологическое действие радиомиметических веществ как в цитологическом, так и в генетическом отношении весьма близко

к действию ионизирующих излучений. Недавно Александр обобщил детальные исследования механизма действия этих веществ. Имеется ряд публикаций, в которых рассматриваются вопросы влияния радиомиметических веществ на микроорганизмы (21, 22, 23, 24), в том числе и на дрожжи. Наше донение несколько расширяет имеющиеся сведения. Мы исследовали действие одного из хлоротиломинов, известного у нас под названием "эмбихин" -  $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}^+$ . Это вещество либо вводили в питательную среду, на которой культивировали микроорганизмы, либо растворяли в физиологическом растворе  $\text{NaCl}$  и приводили в соприкосновение с суспензией дрожжевых клеток в течение 15, 30 и 60 мин. Дрожжи после такой обработки промывали и переносили на питательные среды без эмбихина.

При наблюдении в люминесцентном микроскопе клеток, помещенных в раствор эмбихина, можно видеть, что это вещество обладающее не очень сильной синей люминесценцией, связывается диффузно с протоплазмой клетки. Непосредственных различимых структурных нарушений в клетке эмбихин не вызывает; они начинают проявляться в процессе продолжающегося роста клетки. Ростущие в присутствии эмбихина дрожжевые клетки чрезвычайно похожи на облученные. У них так же, как и у облученных, задерживается деление, происходит, увеличиваются ядра и ядерные кариосомы (рис. 1); кроме того, имеет измельчение и склеивание митохондрий (рис. 2).

Наличие в питательной среде пентоно, гидролизата гемина или дрожжевого автолизата оказывает сильное защитное и реактивирующее действие на клетки, обработанные раствором эмбихина. В физиологическом отношении эмбихин так же, как и излучения, значительно сильнее подавляет размножение и рост клеток чем дыхание и брожение. Однако этот радиомиметик все же относительно резче угнетает дыхание и особенно брожение, чем радиация (если дозы уравниваются по выживаемости клеток). Окислительное фосфорилирование тормозится эмбихином сильнее, чем дыхание, т.е. и в этом отношении имеется сходство с действием излучений. Исследование скорости включения меченого фосфора в различные фракции фосфора содержащих соединений показало, что эмбихин в одинаковой степени тормозит процесс включения как в кислоторастворимую так и в нуклеиновую фракции. В этом существенное отличие эмбихина от радиации, под влиянием которой обмен фосфора во фракциях нуклеиновых кислот подавляется значительно сильнее, чем в кислоторастворимой фракции.

Особенно интересным не только в теоретическом, но и в практическом отношении является то, что

-14-

ние и накопление стеринов в дрожжевых клетках совершенно так же, как и ионизирующие излучения. Так, посев дрожжей на питательную среду после кратковременного выдерживания их в растворе эмбихина (0,1-0,2 мг/мл) приводит к значительному повышению биосинтеза эргостерина (рис.8).

Микроорганизмы, хотя и не очень легко, все же могут быть адаптированы к повышенным концентрациям радиомиметических веществ. Нам удалось после многочисленных пересевов на среды с возрастающим содержанием эмбихина получить штамм *Saccharomyces cerevisiae*, перенесящий в 1000 раз более высокую концентрацию этого хлорэтил-амина по сравнению с исходным. Дыхание и брожение у этого адаптированного штамма оказалось сниженным примерно на 25%. Биосинтез эргостерина протекал нормально. При испытании радиорезистентности этого штамма к облучению дозами 30 000 и 60 000 р, мы получили почти абсолютное совпадение выживаемости исходных и адаптированных к эмбихину дрожжей. Этот факт, конечно, нуждается в более детальном изучении. Тем не менее, такое наблюдение указывает на возможность различий в механизме действия на клетку ионизирующих излучений и радиомиметических веществ.

### З а к л ю ч е н и е

Сдвиги и нарушения в биохимических процессах и структурах, особенно ультраструктурах облученной клетки, требуют более пристального внимания радиобиологов. Несмотря на многочисленные и разнообразные исследования (25, 26), реакции клетки, особенно начальные, на ионизирующие излучения изучены недостаточно.

Сделаем попытку сопоставить основные и общие для различных организмов нарушения в клеточном метаболизме с известными данными о функциональном значении и активности органоидных структур клетки. Мы не будем здесь касаться генетических вопросов.

Митотическое деление ядра, очевидно, наиболее чувствительно к радиации. Известно, что в ряде органов животных митотический индекс заметно изменяется под влиянием таких доз, которые не вызывают каких-либо обнаруживаемых сдвигов в метаболизме клеток. То же наблюдалось нами и у дрожжевых организмов. Несколько большие дозы приводят сначала к временному и обратимому, а затем - к более глубокому угнетению метаболизма ДНК; это обычно сопровождается физико-химическими

и структурными изменениями ядер. Для их влияния руор сцентио микроскопический анализ выявил нарушений в структуре и состоянии ядер представляются перспективами. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения сдвигов в метаболизме ядер облученных клеток. Угнетение окислительного фосфорилирования, происходящие в результате облучения, возможно, частично зависит от снижения активности ядра, но в основном, безусловно, связано с повреждением митохондрий. Повреждение этих же органоидов обуславливает нарушения в отдельных звеньях цикла трикарбоновых кислот и снижение окисления пировиноградной кислоты. Существенно, что далеко не все ферментные системы цикла Кребса являются радиочувствительными. В то время как окисление лимонной, фумаровой и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот при облучении, по-видимому, угнетается, окисление сукцината оказалось весьма радиорезистентным. Связанные с митохондриями процессы аминирования и частично переаминирования также, как выяснилось, в наших исследованиях, страдают от облучения. Весьма радиочувствительной оказалась ферментная система, восстанавливающая янус зеленый. Параллельно с этим, ряд ферментных систем, непосредственно связанных с митохондриями и катализирующих, например, процессы цикла жирных кислот, не только не угнетается, но даже повышает свою активность. Усиливается биосинтез мезоинозита. Возрастает активность и дезоксирибонуклеазы (27,28). Особенно примечательно, однако, то, что отдельные звенья процесса дыхания клетки, осуществляемого рядом ферментов, локализованных на митохондриях, не угнетается даже при весьма значительных дозах облучения. К их числу относится и исследованная нами цитохромоксидаза. Все это указывает на то, что нарушения в митохондриях под влиянием облучения имеют своеобразный мозаичный характер (29,30) и не захватывают целиком всего тела митохондрий. Имеются основания полагать, что те ферменты, которые прочно связаны с оболочками и кристаллами митохондрий, менее повреждаются по сравнению с теми, которые не так прочно связаны или находятся в полостях митохондрий.

Существенную роль в нарушениях функций митохондриального аппарата, совершенно очевидно, играют физико-химические изменения митохондрий: изменения их поверхностных свойств, проницаемости и ряда других. Набухание митохондрий, изменение их конфигурации, окрашиваемости в облученных клетках наблюдалось многими исследователями. Остается, однако, неясным, являются ли эти нарушения первичными или вторичными.

В функционировании митохондрий весьма существенную роль играют их поверхности. На них аккумулируются вещества, подвергающиеся затем воздействию ферментов, расположенных по митохондриям; но них же накапливаются также некоторые иноядные вещества, подлежащие обезвреживанию. Блокирование митохондрий специальными красителями и поверхностноактивными веществами оказывает существенное влияние на функциональную активность этих органоидов.

Оказалось, что приживенное блокирование активных функциональных структур клетки отчетливо снижает радиочувствительность отдельных клеточных функций и повышает выживаемость клеток. Зависит ли это от общего снижения клеточного метаболизма в результате блокирования активных поверхностей или от локальной защиты чувствительных к излучениям внутриклеточных структур, может быть выяснено в дальнейшем.

Ряд прямых и косвенных данных говорит в пользу нарушения функций при облучении другого гранулярного компонента цитоплазмы — микросом. В состав микросом входит примерно половина всей рибонуклеиновой кислоты цитоплазмы. В связи с этим необходимо напомнить о разрушении части рибонуклеопротеидов в цитоплазме клеток, происходящий непосредственно под влиянием облучения (1). При продолжающемся метаболизме происходят резкие изменения в биосинтезе и содержании рибонуклеопротеидов. Изменяется и процесс биосинтеза белка, в значительной мере связанный с функцией микросом. И, наконец, изменения в синтезе и накоплении в клетках стеринов и инозита также, по крайней мере частично, зависят от нарушения нормального функционирования микросом. Является ли это первичной реакцией микросом на облучение или вторичным нарушением, дисфункцией, определяемой повреждениями митохондрий или других компонентов клетки остается еще неясным.

Нами кратко охарактеризованы только некоторые стороны реакции клетки на ионизирующие излучения. Структурная, функциональная и биохимическая гетерогенность клетки и различная радиочувствительность отдельных структур и функций обусловливают сложность и своеобразие ее реакций на излучения. Имеющиеся факты еще недостаточны для построения в этой области общей концепции: намечаются лишь отдельные "точки приложения" радиации к живому субстрату. Предстоит выяснить, какие из них являются первичными, непосредственно затрагивающими излучениями и продуктами радиолиза воды, и какие возникают вторично вследствие взаимосвязанности процессов в клетке.

Несомненно одно: нынче даже о действии излучения на организм рассматривают наши лозунги как в области отдельных органических ионизирующих излучений, так и в области гипотенциальной энергии, которой и физиологии клетки.

### Л и т о р а т у р а

1. Мейсель М.Н. Действие облучения на организм. В сб.: Доклады Советской делегации по Международной Конференции по мирному использованию атомной энергии. Изд. АН СССР, 1955, 78-111
2. Martin L. Compt. rend. Soc. biol., 1946, 140 (25), 1245-1246
3. Martin L. Compt. rend. Soc. biol., 1946, 140 (25), 1201-1202
4. Lazarow A., Cooperstein S.J. Exptl. Cell. Res., 1953, 5(1), 56-69
5. Cooperstein S.J., Lazarow A. Exptl. Cell Res., 1953, 5(1), 82-97
6. Bekkum D.W. van. Ionizing Radiation and Cell Metabolism. Ciba Foundation Symposium. Churchill Ltd. London, 1956, 77-91
7. Bekkum D.W. van. Biochim. et biophys. acta, 1957, 25 (3), 487-492
8. Мейсель М.Н., Помощникова Н.А., Шавловский Н.М., Докл. АН СССР, 1950, 70, 1065
9. Мейсель М.Н. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1938, 6, 295.
10. Hollaender A., Stapleton G.E. Physiol. Revs, 1953, 33, 77
11. Stapleton G.E., Billen D., Hollaender A., J. Bacteriol., 1952, 63, 805
12. Гальцова Р.Д., Мейсель М.Н., Селиверстова Л.А., Докл. АН СССР, 1954, 98, 1013
13. Гальцова Р.Д., Вакина И.Н. Тезисы докл. Всес. Научно-техн. конф. по примен. радиоакт. и стабильн. изотопов и излучений в народном хозяйстве и науке. Биология, медицина, сельское х-во, 1957, стр. 61
14. Neber M. Z. phys. Chem., 1935, 234, 83
15. Краунштейн А.Е., Крицман М.Г. Биохимия, 1937, 2, 242
16. Jones D.B., Moeller O.J. Biol. Chem., 1928, 79, 429
17. Henderson B.J., Baxter R.C., Tuttle L.W., Radiation Res., 1957, 7 (3), 321

- 18 -

18. Elliot A.M., Gross J.A., Brownell L.E. J. Protozoology, 1954, 1, 193
19. Muller J. Nature, 1956, 178(4523), 43
20. Alexander P., Cousens Sh.F., Stacey K.A. Drug Resistance in Microorganisms. Ciba Foundation Symposium. Churchill Ltd. London, 1957, 294-318
21. Hutchens J., Podolsky B. J. Cellular and Compar. Physiol., 1954, 43, 205
22. Kinsey V., Grant W. J. Cellular and Compar. Physiol., 1947, 29(1), 51
23. Roiteneau H., Poulet G. J. physiol. France, 1955, 47(3), 605-619
24. Loveless A., Spoerl E., Neisman T. J. Bacteriol., 1954, 68(6), 637
25. Errera M. Protoplasmatologica. Handbuch der Protoplasmaforschung, Springer-Verlag, Wien, 1957, 10(3), 1-241
26. Wolstenholme G.E.W., O'Connor C.M. Edit. Ionizing Radiation and Cell Metabolism. Ciba Foundation Symposium, London, 1956
27. Okada Sh., Kales E. Exptl. Cell Res., 1956, 11(1), 212-214
28. Okada Sh., Peachey L.D. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1957, 3(2), 239-247
29. Ryser H., Nebi H., Zuppinger A. Experientia, 1954, 10(7), 304-305
30. Fritz-Niggli H. Naturwissenschaften, 1956, 43(18), 425-426

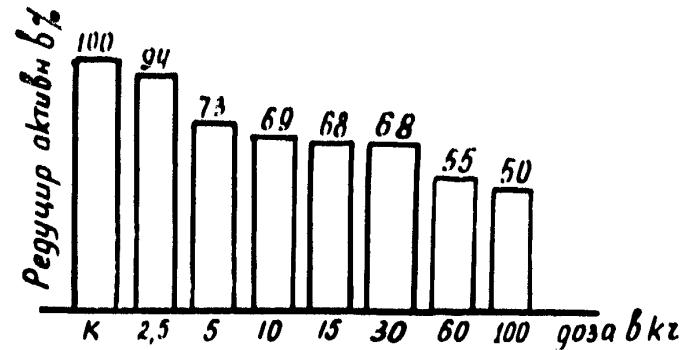


Рис.1. Снижение редуцирующей активности клеток в зависимости от дозы облучения (восстановление януса зеленого)

2537

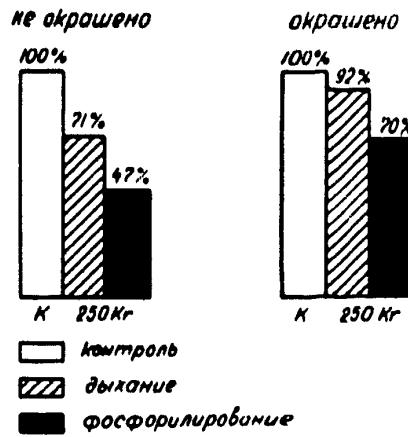


Рис.2. Влияние блокирования ("окрашивания") митохондрий берберином на дыхание и фосфорилирование облученных клеток *Saccharomyces ludwigii*.

Интенсивность дыхания и фосфорилирования необлученных клеток принята за 100%. Доза облучения 250 кр

-20-

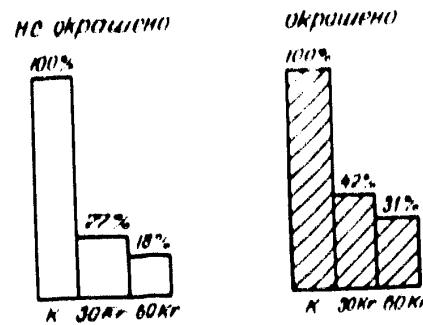


Рис.3. Влияние блокирования ("окрашивания") митохондрий берберином на выживаемость (в %) клеток *Saccharomyces ludwigii*.  
Дозы облучения 30 и 60 кр.  
К-выживаемость контролльных, необлученных клеток

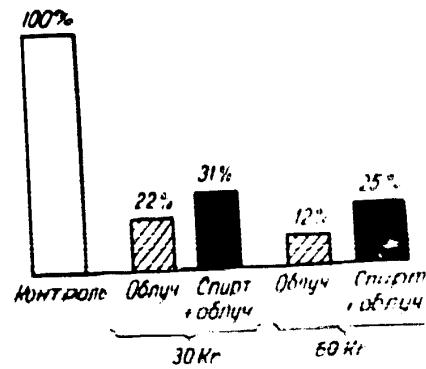


Рис.4. Влияние этилового спирта на выживаемость (в %) клеток *Saccharomyces ludwigii* после облучения (дозы 30 и 60 кр). Выживаемость контролльных, необлученных клеток принята за 100%

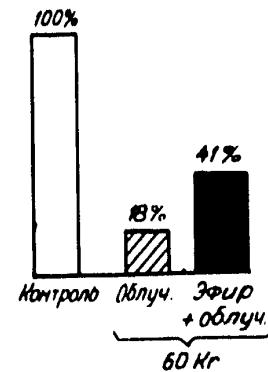


Рис.5. Влияние этилового эфира на выживаемость (%) клеток *Saccharomyces cerevisiae ludwigii* (доза 60 кр). Выживаемость контрольных необлученных клеток принята за 100%

7652



Рис.6а. Индомусев магніфі. Клетки из  
контрольной культуры

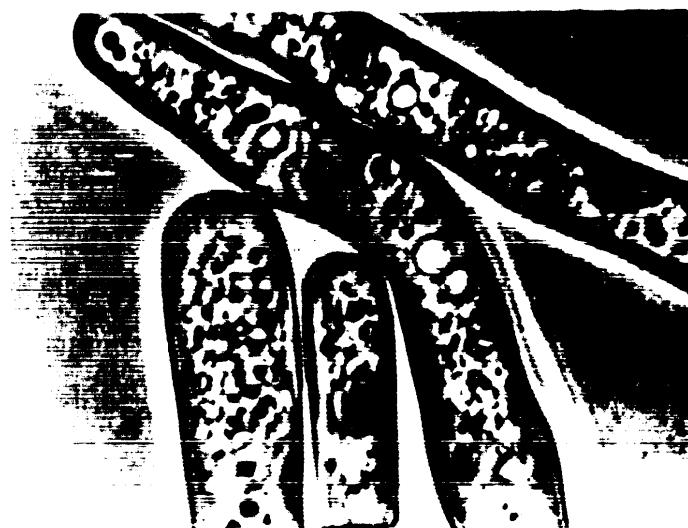


Рис.6б. Индомусев магніфі. Клетки из куль-  
туры с эмбрионом



Рис.7а. Митохондрии в клетках нормальной культуры.

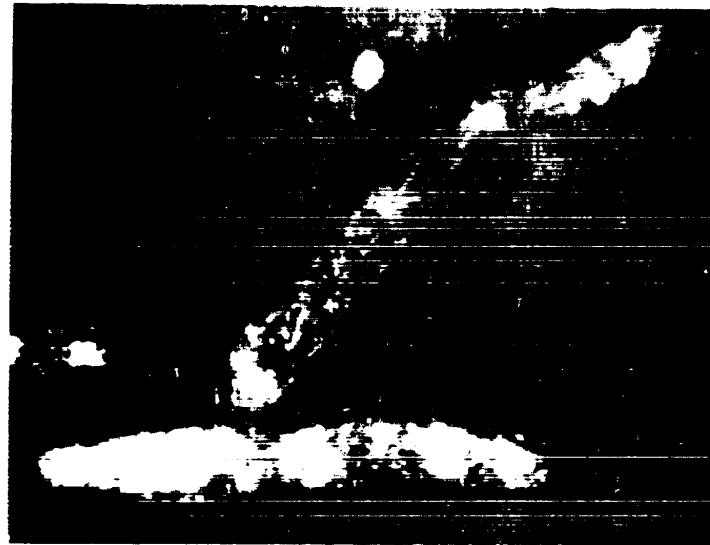


Рис.7б. То же после культивирования с динитрофенолом

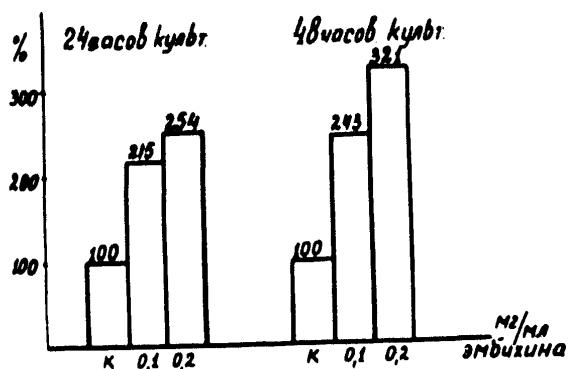


Рис.8. Синтез эргостерина дрожжами  
*Saccharomyces cerevisiae*,  
обработанными эмульсией

30E 2597